



# TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL SUR LA BREVETABILITÉ

(chapitre II du Traité de coopération en matière de brevets)

(article 36 et règle 70 du PCT)

|   |   |   |
|---|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire   | <b>POUR SUITE À DONNER</b><br>voir le formulaire PCT/PEA/416  |   |
| Demande internationale No.<br>PCT/FR2005/000479   | Date du dépôt international ( <i>jour/mois/année</i> )<br>28.02.2005  | Date de priorité ( <i>jour/mois/année</i> )<br>27.02.2004 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB<br>INV. C12N1/02 C12M1/12 A23L1/30 A23L2/52 A23C9/152  |   |   |
| Déposant<br>COMPAGNIE GERVAIS DANONE et al.   |   |   |
| <p>1. Le présent rapport est le rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international en vertu de l'article 35 et transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p>3. Ce rapport est accompagné d'ANNEXES, qui comprennent :</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> un total de (<i>envoyées au déposant et au Bureau international</i>) 4 feuilles, définies comme suit :</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> les feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou des feuilles contenant des rectifications autorisées par la présente administration (voir la règle 70.16 et l'instruction administrative 607).</p> <p><input type="checkbox"/> des feuilles qui remplacent des feuilles précédentes, mais dont la présente administration considère qu'elles contiennent une modification qui va au-delà de l'exposé de l'invention qui figure dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée, comme il est indiqué au point 4 du cadre n° I et dans le cadre supplémentaire.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> (<i>envoyées au Bureau international seulement</i>) un total de (préciser le type et le nombre de support(s) électronique(s)) , qui contiennent un listage de la ou des séquences ou un ou des tableaux y relatifs, déposés sous forme électronique seulement, comme il est indiqué dans le cadre supplémentaire relatif au listage de la ou des séquences (voir l'instruction administrative 802).</p> |   |   |
| <p>4. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre n° I Base du rapport</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre n° II Priorité</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre n° V Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre n° VI Certains documents cités</p> <p><input type="checkbox"/> Cadre n° VII Certaines irrégularités dans la demande internationale</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Cadre n° VIII Certaines observations relatives à la demande internationale</p>   |   |   |
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international<br>15.12.2005  | Date d'achèvement du présent rapport<br>07.06.2006  |   |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international<br> Office européen des brevets<br>D-80298 Munich<br>Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d<br>Fax: +49 89 2399 - 4465   | Fonctionnaire autorisé<br>Espen, J<br>N° de téléphone +49 89 2399-8410<br> |   |

Demande internationale n°  
PCT/FR2005/000479

## Formulaire PCT/PEA/409 (avril 2005)

# **RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL SUR LA BREVETABILITÉ**

Demande internationale n°  
PCT/FR2005/000479

---

## **Cadre-n° V Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

---

### **1. Déclaration**

|  |      |                |            |
|--|------|----------------|------------|
| Nouveauté                              | Oui: | Revendications | 1-20,24-28 |
|  | Non: | Revendications | 21-23      |
| Activité inventive                     | Oui: | Revendications | 1-20,24-28 |
|  | Non: | Revendications | 21-23      |
| Possibilité d'application industrielle | Oui: | Revendications | 1-28       |
|  | Non: | Revendications |            |

### **2. Citations et explications (règle 70.7) :**

**voir feuille séparée**

---

## **Cadre n° VIII Observations relatives à la demande internationale**

---

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins ou de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**RAPPORT PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL  
SUR LA BREVETABILITÉ  
(FEUILLE SÉPARÉE)**

Demande internationale n°

PCT/FR2005/000479

**Concernant le point V**

**Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: CRESPO, J. P. S. G. ET AL: "Tangential flow filtration for continuous cell recycle culture of acidogenic bacteria" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 47(1), 205-14 CODEN: CESCAC; ISSN: 0009-2509, 1992, XP009034901
- D2: MAUS J E ET AL: "Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria." JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 1, 2003, pages 146-154, XP002334925 ISSN: 1364-5072
- D3: HAYAKAWA K ET AL: "HIGH DENSITY CULTURE OF LACTOBACILLUS-CASEI BY A CROSS-FLOW CULTURE METHOD BASED ON KINETIC PROPERTIES OF THE MICROORGANISM" JOURNAL OF FERMENTATION AND BIOENGINEERING, vol. 70, no. 6, 1990, pages 404-408, XP002335665 ISSN: 0922-338X

Le document D1 décrit un dispositif qui est apte pour la mise en oeuvre d'un procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables à usage alimentaire en ce qu'il comprend une cuve contenant une solution de lavage (feed vessel), un conduit d'arrivée de ladite solution dans un fermenteur (reactor), un conduit de sortie pour acheminer le milieu de culture contenant les bactéries vers deux modules de microfiltration tangentielle. Chaque module possède une membrane d'une surface totale de 0,1 m<sup>2</sup>. Lesdits modules permettent la séparation du dit milieu de culture en un perméat ne contenant pas de bactéries et en un concentrât contenant les bactéries. De plus, D1 divulgue un dispositif caractérisé en ce que le concentrât est recyclé à la sortie des modules de filtration tangentielle par réincorporation dans le fermenteur.

Le document D2 décrit un procédé de production de bifidobactéries adaptées, où l'adaptation étant mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture et/ou de paramètres des bactéries (D2, p. 148, colonne de gauche). Au vu de D2 (p. 148), les bactéries résultant de ce procédé sont adaptées à un milieu (pH) acide et une température diminuée. De plus, D2 décrit un yaourt additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire comprend les susdites bifidobactéries adaptées et viables.

En addition, D2 mentionne qu'après 2,5 à 5 heures d'exposition de bactéries du genre *Bifidobacterium lactis* au yaourt, il n'y a pas une différence significative en ce qui concerne la tolérance à l'acidité entre les bactéries adaptées et non-adaptées (D2, p. 152-153).

Le document D3 décrit un procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries, à usage alimentaire comprenant les étapes successives suivantes:

- a) On propage les bactéries dans un fermenteur dans un milieu de culture approprié ;
- b) On dilue avec du milieu de culture frais à un taux qui correspond à la concentration de la masse cellulaire;
- c) On concentre en bactéries le milieu contenant les bactéries par microfiltration tangentielle (cross-flow) jusqu'à une concentration bactérienne de  $11^{11}$  ufc/ml;
- d) On récupère un concentrât liquide de bactéries, à usage alimentaire

En particulier, le susdit procédé est effectué avec le but d'enlever des métabolites inhibant.

1). La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33 (1) PCT, l'objet des revendications 21-23 n'étant pas conforme au critère de nouveauté défini par l'article 33 (2) PCT.

1.1). Au vu des remarques faites ci-dessus, le document D1 décrit un dispositif ayant toutes les caractéristiques techniques des revendications 21-23. Par conséquent ledit dispositif est apte pour la mise en oeuvre d'un procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables à usage alimentaire. Donc, l'objet des revendications 21-23 n'est pas nouveau.

2). Au vu des documents cités, il semble que l'objet des revendications 1-20 et 24-28 remplit d'une manière formelle les conditions énoncées à l'article 33 (2) PCT.

3). La solution proposée dans les revendications 1-20 et 24-28 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive (article 33(3) PCT), et ce pour les raisons suivantes:

3.1). Le document D2 est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche. Au vu des commentaires faits ci-dessus, le procédé de la revendication 1 diffère du contenu de D2, en ce qu'on lave le milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle jusqu'à ce qu'on obtient une concentration bactérienne supérieure à  $5 \times 10^{10}$  et avantageusement supérieure à  $1 \times 10^{11}$  ufc/ml.

3.2). Le problème que se propose de résoudre la présente invention peut donc être considéré comme étant d'enrichir l'état de la technique avec un concentrât liquide de bactéries actives et viables à usage alimentaire.

3.3). L'homme du métier qui veut réaliser la production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, n'aurait pas considéré le document D3, qui a trait à un lavage de bactéries par microfiltration tangentielle avec le but d'enlever des métabolites non-souhaités du milieu de culture.

3.4). En conséquence, l'objet des revendications 1-20 et 24-28 n'a pas pu être réalisé d'une manière évidente.

#### **Concernant le point VIII**

#### **Certaines observations relatives à la demande internationale**

Le jeu de revendications ne remplit pas les conditions énoncées à l'article 6 PCT.

1). Au vu de la page 2 de la description, il paraît que l'étape de filtration tangentielle, sous certaines conditions particulières permet de concentrer les volumes souhaités de culture de bactéries, tout en préservant leur viabilité et sans colmatage des filtres.

Les dites conditions particulières sont considérées étant des caractéristiques essentielles à la réalisation de la présente demande internationale.

2). Le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables (revendication 24) et le produit alimentaire additivé (revendication 26) sont complètement déficient au vu de l'article 6 PCT, car ils ne comprennent aucune vraie caractéristique technique, qui permettrait de le distinguer des divulgations faites en D2.

10/590658

IAP9 Rec'd PCT/PTO 25 AUG 2006

## REVENDEICATIONS

1. Procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, à  
5 usage alimentaire comprenant les étapes successives suivantes :
- a) On propage les bactéries dans un fermenteur dans un milieu de culture approprié ;
  - b) On adapte les bactéries obtenues à l'étape a) ;
  - c) On lave le milieu de culture contenant les bactéries adaptées par  
10 microfiltration tangentielle avec l'aide d'une solution de lavage ;
  - d) On concentre en bactéries le milieu lavé contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle jusqu'à une concentration bactérienne supérieure à  $5.10^{10}$  ufc/ml avantageusement supérieure à  $1.10^{11}$  ufc/ml ;
  - e) On récupère un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables, à usage  
15 alimentaire
- et où l'adaptation des bactéries effectuée à l'étape b) est mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture et/ou de paramètres des bactéries.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les bactéries sont des  
20 bactéries lactiques, en particulier des bactéries du genre *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp et *Lactococcus* spp.
3. Procédé selon la revendication 1 et 2, caractérisé en ce que le milieu de culture de l'étape a) est un milieu synthétique.  
25
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le milieu de culture contenant les bactéries dans le fermenteur à la fin de l'étape a) a un pH compris entre 3 et 6.
- 30 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration en bactéries à la fin de l'étape a) de propagation est supérieure à  $2.10^{10}$  ufc/ml.

6. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les paramètres du milieu de culture sont le pH la pression osmotique et/ou la température du milieu de culture.
7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que le paramètre du milieu de culture est le pH et en ce que l'étape b) est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.
8. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que le paramètre du milieu de culture est la température et en ce que l'étape b) est réalisée par diminution de la température.
9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 6, 7, 8 caractérisé en ce que le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.
10. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que la distribution des longueurs de chaque bactérie se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.
11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape b) d'adaptation est réalisée par microfiltration tangentielle.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la ou les membranes de microfiltration tangentielle ont une porosité comprise entre 0,01 et 0,5  $\mu\text{m}$ , avantageusement entre 0,1 et 0,3  $\mu\text{m}$ .
13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans l'étape c) la pression d'entrée du milieu de culture dans le module de microfiltration est comprise entre 0 et  $3 \cdot 10^5$  Pa.
14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans les étapes c) et d) le débit du perméat est compris entre 0,001 et 0,1  $\text{m}^3/\text{h}/\text{m}^2$  de surface d'échange.



15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans l'étape d) la pression transmembranaire est comprise entre  $0,1 \cdot 10^5$  et  $2 \cdot 10^5$  Pa et avantageusement entre  $0,1 \cdot 10^5$  et  $0,5 \cdot 10^5$  Pa.

5

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans l'étape d) le débit de recirculation du milieu lavé est compris entre 0,5 et 3  $m^3/h/m^2$  de surface d'échange et avantageusement entre 0,8 et 1,25  $m^3/h/m^2$  de surface d'échange.

10

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend préalablement à l'étape a) les étapes successives de revivification et préculture des bactéries.

15 18. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire f), après l'étape e) de conditionnement en poches souples et hermétiques du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables.

20 19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire g), après l'étape f), de conservation à une température comprise entre  $-50^\circ C$  à  $+4^\circ C$  du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples et hermétiques.

25 20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend une étape supplémentaire h), après l'étape g), de réchauffage par un moyen adapté du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples et hermétiques.

30 21. Dispositif pour la mise en œuvre du procédé de production d'un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables à usage alimentaire selon l'une quelconque des revendications 1 à 20 caractérisé en ce qu'il comprend une cuve (1) contenant une solution de lavage, un conduit d'arrivée (2) de ladite solution de lavage dans un fermenteur (3), ledit fermenteur (3) servant à la propagation des bactéries dans un

milieu de culture, un conduit de sortie (4) pour acheminer le milieu de culture contenant les bactéries vers un ou plusieurs modules (5) de microfiltration tangentielle, lesdits modules (5) permettant la séparation dudit milieu de culture en un perméat (6) ne contenant pas de bactéries et en un concentrât (7) contenant les bactéries.

5

22. Dispositif selon la revendication 21, caractérisé en ce que le concentrât (7) est recyclé à la sortie des modules (5) de filtration par réincorporation dans le fermenteur (3).

10

23. Dispositif selon les revendications 21 et 22 caractérisé en ce que le ou les modules (5) de filtration comprennent de 1 à 10 membranes de filtration, chaque membrane représentant de 0,1 m<sup>2</sup> à 150 m<sup>2</sup> de surface totale de filtration.

15

24. Concentrât liquide de bactéries adaptées et viables caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 20.

20

25. Utilisation du concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon la revendication 24 en tant qu'additif alimentaire.

26. Produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon la revendication 24.

25

27. Produit alimentaire additivé selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un produit laitier et/ou d'une boisson.

30

28. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon l'une quelconque des revendications 26 ou 27, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et préférentiellement avant le conditionnement du produit alimentaire.